

PROF. GIOVANNI MARTINOTTI

13923

La cultura del bacillo tubercolare sui substrati colorati

Tecnica

NOTA

letta alla R. Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna
nell'adunanza delli 28 maggio 1905.



BOLOGNA

TIPOGRAFIA GAMBERINI E PARMEGGIANI

1905

PROF. GIOVANNI MARTINOTTI

La cultura del bacillo tubercolare sui substrati colorati

NOTA

letta alla R. Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna
nell'adunanza delli 28 maggio 1905.

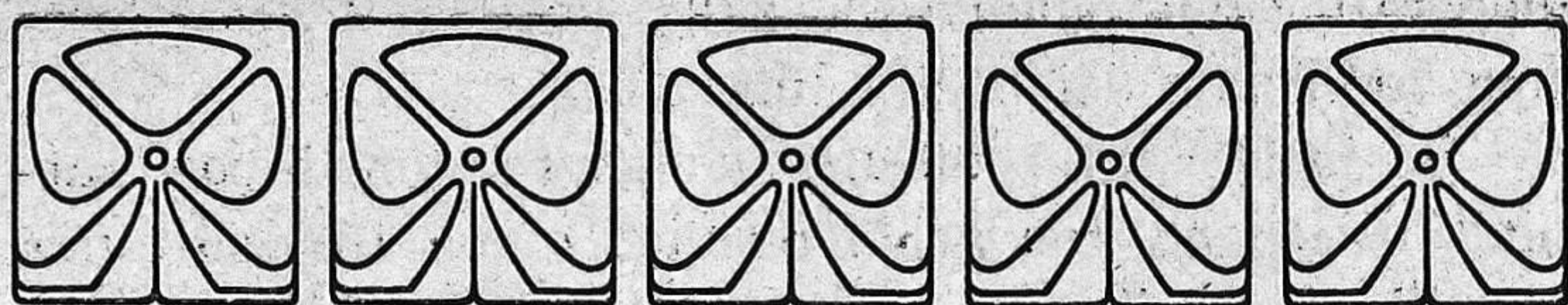


BOLOGNA

TIPOGRAFIA GAMBERINI E PARMEGGIANI

—
1905

Estratto dal *Rendiconto delle Sessioni della R. Accademia delle Scienze*
dell' *Istituto di Bologna*. — Anno accademico 1904-1905



Nel corso dei miei studii sulla tubercolosi ho voluto indagare come si sviluppasse il bacillo della tubercolosi sui mezzi artificialmente colorati.

Quale substrato di coltura solido ho adoperato il comune agar con peptone e glicerina ; come mezzi liquidi ho impiegato varie soluzioni a base di albuminati e di caseinati alcalini che per lunga esperienza mi diedero sempre eccellenti risultati nella coltura del micro-organismo suddetto.

Tra le sostanze coloranti ho scelto :

la tintura di tornasole e quella di lacmoide allo scopo di constatare se il bacillo della tubercolosi, crescendo su questi mezzi, inducesse una modificazione nella reazione del substrato ;

il Sudan III, che ha proprietà elettive per i grassi, i quali si sa che abbondano nel corpo del bacillo suddetto ;

il bleu di metilene, il rosso neutro, il bruno Bismark, che finora diedero i migliori risultati nella colorazione cosiddetta *vitale* degli organismi animali e vegetali ;

il violetto di genziana e la fucsina basica, largamente

adoperati, come ognuno sa, nella pratica della colorazione artificiale dei bacilli tubercolari.

Ho inoltre fatto culture su mezzi colorati con carminio di indaco, con acido rosolico e con altre sostanze, ma all'infuori di un decoloramento delle soluzioni non ho osservato fatti di particolare importanza.

Sui liquidi colorati con violetto di genziana e con fucsina basica i bacilli tubercolari si sviluppano rigogliosamente (*senza punto colorarsi*) ma solo quando la sostanza colorante sia aggiunta al substrato in quantità infinitamente piccola.

Il Sudan III si mostrò meno velenoso per i bacilli, i quali però non si colorarono affatto con questo metodo.

I migliori risultati li ottenni col bleu di metilene, col rosso neutro e col bruno Bismark, la cui azione tossica è minima e va decrescendo dal primo all'ultimo dei tre mezzi di cultura accennati. In tutti e tre i bacilli si sviluppano nel modo più rigoglioso, anche quando i liquidi sono abbastanza intensamente colorati.

Col bruno Bismark si ha una colorazione ma poco pronunciata dei bacilli.

Col rosso neutro invece e col bleu di metilene si ha una colorazione intensa e, quasi direi, satura delle colonie nelle loro parti meno giovani.

All'esame microscopico si rileva che i bacilli sono colorati intensamente, ma non in totalità; rimangono cioè scolorate delle parti che appaiono come vacuoli.

Tingendo questi bacilli col metodo ordinario di Ziehl compaiono in essi numerose quelle forme che si sogliono considerare come degenerative od involutive; è difficile però stabilire se i vacuoli che si vedono in questi preparati corrispondono esattamente a quelli che compaiono nei bacilli che si tingono nelle culture con rosso neutro e con bleu di metilene.

Si tratta di una colorazione *vitale*?

Per risolvere tale quesito ho fatto alcuni trapianti

di bacilli così colorati ma i tentativi finora diedero risultati negativi.

Non mi credo però autorizzato a concludere in modo assoluto, sia perchè poche furono le esperienze finora compiute e non tutte eseguite nelle condizioni le più favorevoli.

L'aspetto vacuolare dei bacilli, l'insuccesso dei trapianti, il fatto del trovarsi i bacilli colorati soltanto nelle parti più antiche delle culture deporrebbero per una colorazione indipendente dalla vitalità; d'altra parte è da notare che i bacilli presentano un colore molto più intenso del liquido in cui si sviluppano, che nei substrati solidi questi bacilli si trovano al disopra del piano della cultura; che nei mezzi liquidi i bacilli che cadono al fondo non si colorano affatto, quindi non può trattarsi di una colorazione puramente passiva.

Molto probabilmente la colorazione avviene solo in un certo stadio del ciclo evolutivo dei bacilli, avendo varii autori giustamente osservato che i bacilli della tubercolosi presentano una differente composizione chimica secondo il periodo del loro sviluppo.

Quanto alla reazione ho potuto nettamente constatare in una larghissima serie di esperienze che il bacillo della tubercolosi induce una diminuzione della reazione alcalina del substrato: tale modificazione compare ad un certo periodo che varia secondo la natura del substrato, si accentua alquanto in un periodo ulteriore, ma senza giungere mai ad una reazione acida decisa.

Per quanto a me consta ricerche nel senso da me esposto furono fatte soltanto dal Chancel (1) che coltivò il bacillo della tubercolosi su patate impregnate di brodo glicerinato, al quale era stato aggiunto del bleu di metilene in varie proporzioni.

(1) Chancel P. F. E. — Étude clinique et expérimentale de l'action du bleu de méthylène comme anti-tuberculeux-Lille 1904.

Egli trovò che il bacillo della tubercolosi si sviluppava bene sui substrati contenenti il bleu di metilene in proporzioni minori.

Dai dati contenuti nel lavoro del Chancel questi avrebbe visto che il bacillo della tubercolosi cresce in mezzi contenenti il bleu di metilene in proporzioni molto superiori a quelle tollerate nelle mie esperienze: tale differenza può dipendere o dalla natura del substrato o, più probabilmente, dalla qualità del bleu di metilene adoperato.

L' Himmel (1) tentò la colorazione vitale del bacillo della tubercolosi col rosso neutro, ma in condizioni molto diverse dalle mie.

Questo autore dice innanzi tutto di avere osservato che il bacillo della tubercolosi umana e della tubercolosi aviaria, non fissano affatto la sostanza colorante del rosso neutro finchè sono vivi, mentre che si colorano debolmente dopo che sono morti ed aggiunge che il tempo non influisce sull'intensità della colorazione. Pare che abbia fatto queste osservazioni tenendo i bacilli in gocce pendenti di liquido contenente il rosso neutro.

Inoltre l' Himmel iniettò nel peritoneo di cavie bacilli della tubercolosi umana e della tubercolosi aviaria e trovò che i bacilli della prima varietà, inglobati entro i leucociti, si colorano male, mentre nelle stesse condizioni si colorano abbastanza bene, ma per un tempo limitato, i bacilli della tubercolosi aviaria.

Un fatto inverso avviene iniettando sotto la cute di un piccione o di un pollo le due varietà di bacillo della tubercolosi. Ed egli conchiude che la colorazione per opera del rosso neutro dei batterii inglobati dai leucociti

(1) Himmel I. — Le rouge neutre (neutralroth) Son rôle dans l'étude de la phagocytose en général et dans celle de la blennorrhagie en particulier. (Annales de l'Institut Pasteur, Tome XVI, 1902, pag. 663).

è la conseguenza delle proprietà ossidanti di questi ultimi e può fornire un criterio dell'immunità di un animale rispetto ad un dato batterio.

Onde l'A. ammette (1) che in queste condizioni possano colorarsi, benchè debolmente, i bacilli della tubercolosi vivi.

Anche Nakanishi (2) studiò la colorazione dei bacilli tubercolari viventi col bleu di metilene e trovò che essi si colorano molto facilmente e molto rapidamente in modo uniforme.

Egli adoperò culture giovani, mettendo in contatto sotto il campo del microscopio i bacilli con una soluzione di bleu di metilene.

A questo metodo (che si scosta ancora di più da quello che io ho adoperato) si avvicina quello impiegato dal Grimme (3) nello studio del *Bacterium phlei* (un bacillo che ha molte rassomiglianze con quello della tubercolosi). Colorando a fresco col bleu di metilene i bacilli soprannominati osservò che, se giovani si colorivano parzialmente, se vecchi non si colorivano quasi affatto.

Ernst (4) tentò invano la coltura di bacterii su mezzi colorati con bleu di metilene e rosso neutro, onde sperimentò la colorazione diretta su varii bacterii, ma non sul bacillo della tubercolosi.

I risultati delle sue ricerche lo conducono a rite-

(1) Himmel. loc. cit. pag. 683.

(2) Nakanishi K. — Ueber den Bau der Bakterien. (Centralblatt für Bakteriologie etc. I. Abt. Band XXX. 1901. N. 3 e seg. pag. 155).

(3) Grimme A. — Die wichtigsten Methoden der Bakterienfärbung etc. (Centralblatt für Bakteriologie etc. I. Abt. Band XXXII. 1902. N. 1 e seg. pag. 82).

(4) Ernst P. — Ueber den Bau der Bakterien. (Centralblatt für Bakteriologie. II. Abt. Band. VIII. 1902. N. 1).

nere coll'Overton che la colorazione vitale col bleu di metilene e col rosso neutro si faccia coll'intermezzo di corpi grassi presenti nel corpo dei bacterii, corpi grassi che furono dimostrati abbondanti nell'interno dei bacilli tubercolari.

Ed egli conchiude il suo importante lavoro dicendo che se nello spiegare il modo di queste colorazioni spontanee siamo ancora nel campo delle ipotesi, i fatti finora accertati sono della massima importanza per spiegare il modo di azione dei bacterii, la loro struttura, le modalità delle loro funzioni secretorie, la loro azione tossica; questi fatti inoltre aprono la via ad intendere come i corpi sciolti possano agire sui bacterii. Le soluzioni coloranti possono compenetrare il corpo dei bacterii, in modo analogo a quanto fanno le alessine, ed altri corpi capaci di proteggere e di difendere l'organismo contro le infezioni, onde questi fatti potrebbero darci la chiave dei più ardui problemi della patologia delle malattie infettive.

